

玉米子粒粉质突变体 3901I 的图位克隆

冯 帆, 姚东升, 宋任涛

(上海大学生命科学学院/上海市能源作物育种及应用重点实验室, 上海 200444)

摘 要: 粉质胚乳突变体 3901I 来源于美国种质中心, 该突变体胚乳呈现完全不透明表型。生化分析发现, 该突变体 α -和 β -醇溶蛋白剧烈下降, 同时伴随着非醇溶蛋白的大幅度升高。通过玉米 SNP3072 芯片进行基因分型分析发现, 3901I 基因定位于 7 号染色体约 33 M 的区间。通过与 *o2* 突变体进行等位测试, 确认 3901I 是 *o2* 的等位突变体。进一步研究表明, 该突变体的 *O2* 转录本缺失了一个 61-bp 的外显子, 造成开放阅读框移码和翻译提前终止。利用 *O2* 特异抗体检测子粒总蛋白, 发现突变体中 *O2* 蛋白完全缺失, 不能检测到提前终止的 *O2* 蛋白, 说明错误翻译的 *O2* 蛋白被机体快速识别并降解。

关键词: 玉米; 粉质胚乳; *opaque2*; 醇溶蛋白

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Map-based Cloning of an Opaque Kernel Mutant 3901I in Maize

FENG Fan, YAO Dong-sheng, SONG Ren-tao

(Shanghai Key Laboratory of Bio-Energy Crops /

School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: An opaque mutant 3901 of maize, obtained from the Maize Genetics Cooperation Stock Center, USA, showed completely non-transparency endosperm. Biochemical analysis showed that the α - and β -zein in mutant 3901 was drastically decreased, while the non-zein significantly increased. Through the analysis of maize SNP3072 genotyping array, the mutant gene 3901I was mapped to a 33-Mb interval on chromosome 7. Further, the allelism test of *opaque2(o2)* and 3901I indicated that 3901I is a new mutant allele of *o2*, in the *O2* transcript of which a 61-bp exon was lost, causing frame-shift of *O2* open reading frame and an early termination of *O2* protein translation. Also through the total protein detection using *O2*-specific antibody, we found that *O2* protein is completely lost in the kernel of mutant 3901 and no early terminated *O2* protein was detected, which indicated that the *O2* protein was degraded rapidly in 3901. Thus, a new *o2* mutant allele was indentified.

Key words: Maize; Opaque endosperm; *opaque2*; Zein

玉米是世界上最重要的粮食作物之一, 同时也是重要的遗传学和分子生物学研究材料。胚乳作为玉米子粒主要的营养储藏器官, 其主要营养物质是储藏型淀粉和储藏型蛋白。储藏型淀粉的含量是决定玉米子粒产量的重要决定因素, 储藏型蛋白则决定了玉米子粒的营养品质。储藏型蛋白中 60% 以上的蛋白是由醇溶蛋白组成, 根据醇溶蛋白的序列

和溶解特性可以分为以下 4 种类型: α -醇溶蛋白 (19 kD 和 22 kD)、 β -醇溶蛋白 (14 kD)、 γ -醇溶蛋白 (16 kD、27 kD 和 50 kD) 和 δ -醇溶蛋白 (10 kD 和 18 kD)^[1,2]。 α -醇溶蛋白和 γ -醇溶蛋白是最主要的两类醇溶蛋白, 根据遗传背景的不同, 约占总醇溶蛋白的 60%~70% 和 20%~25%^[3]。

玉米粉质胚乳(*opaque* 或者 *floury*)突变体是指胚乳质地蓬松、光下呈现不透明表型的一类突变体。目前, 全世界范围内已成功克隆和功能分析了多个粉质胚乳突变体如 *opaque1(o1)*、*o2*、*o5*、*o6*、*o7*、*o10*、*o11* 和 *floury1-4* 等^[4~15], 其中, 大部分突变体是由于醇溶蛋白的含量或分布改变而引起的突变表型。在这些粉质胚乳突变体中, 最重要的是 *o2* 突变体^[16~19]。*o2* 突变体中 α -醇溶蛋白下调最剧烈, 其

录用日期: 2018-05-15

基金项目: 国家“十三五”重点研发项目(2016YFD0101003)

作者简介: 冯 帆(1989-), 女, 博士, 主要从事玉米分子遗传学研究。E-mail: fengfan_102@163.com

宋任涛为本文通讯作者。E-mail: rentaosong@cau.edu.cn

中,14 kD-和22-kD醇溶蛋白基本消失,*o2*的突变同时伴随着非醇溶蛋白的大幅度升高,造成必需氨基酸的含量(如赖氨酸和色氨酸)显著提高,极大地增强了玉米子粒的营养品质。*O2*基因编码了一个胚乳特异的bZIP类型的转录因子,可识别和结合*O2*-box(TCCACGT),具有较强的转录激活能力^[20, 21]。本实验室研究表明,*O2*调控除16-kD和18-kD以外所有醇溶蛋白,说明*O2*是保证醇溶蛋白正常转录的关键转录因子。

本研究结合遗传、生化和分子生物学等研究手段,对来源于美国种质中心的典型粉质胚乳突变体3901I进行研究,确认该突变体是*o2*的一个新的等位突变体,并揭示了其突变本质,为其他研究者利用该遗传材料进行进一步分子机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米子粒突变体3901I(编号为o*-N436C)获得于美国种质中心(Maize Genetics Cooperation Stock Center),将3901I突变体与玉米W22自交系进行杂交获得F₁群体,F₁群体自交获得F₂群体用于后续研究。

1.2 试验方法

1.2.1 硼酸钠裂解法抽提玉米子粒胚乳的醇溶蛋白

本方法参照参考文献[22],具体方法如下:取F₂代果穗上的野生型和突变体子粒各10粒,去皮去胚,留下胚乳用于后续试验。用液氮将胚乳研磨至粉末,在抽干机中抽干至恒重;精确称量50 mg胚乳粉末,加入1 mL石油醚用于去除油脂,涡旋混匀后,4℃旋转1 h。13 000 r/min离心15 min,弃上清,将粉末抽干至恒重;加入1 mL硼酸钠裂解液(终浓度为12.5 mmol/L的硼酸钠,1% SDS),20 μL的β-巯基乙醇,1 mmol/L的PMSF,涡旋混匀后4℃旋转过夜;13 000 r/min离心15 min,将上清全部转移至新的EP管中,此上清即为总蛋白;吸取300 μL总蛋白溶液,加入700 μL的无水乙醇,涡旋混匀后4℃旋转3 h,13 000 r/min离心15 min,将上清全部吸至新的EP管中,此上清液则为醇溶蛋白;将此上清液抽干至恒重,加入200 μL IPG溶液(终浓度为8 mol/L尿素,2% CHAPS)溶解,-80℃冰箱保存;将上一步离心后得到的沉淀用70%乙醇清洗两遍,室温晾干后溶于200 μL的IPG溶液中,弹匀溶解。将得到的醇溶蛋白和非醇溶蛋白加入1/5体积5x蛋白上样缓冲液和1/10体积的1 mol/L的DTT,99℃变性10 min后上样;用12.5%的SDS-PAGE蛋白胶电泳90 min,考马斯亮

蓝染色观察。

1.2.2 玉米子粒基因组的大量制备

采用CTAB抽提法^[23],具体如下:取玉米子粒液氮研磨至粉末,放入50 mL离心管,加入10 mL CTAB抽提液(100 mmol/L的Tris-HCl,pH值为8.0;20 mmol/L的EDTA,pH值为8.0;100 mmol/L的NaCl,1%的月桂基肌氨酸钠),颠倒混匀后,室温静置10 min,加入10 mL酚:氯仿:异戊醇=25:24:1,剧烈震荡混匀,10 000 r/min离心10 min;将上清转移至新的50 mL离心管中,加入0.7倍体积的异丙醇,混匀至出现絮状沉淀;将沉淀转移至2 mL EP管中,加入1 mL的70%乙醇洗3遍,65℃烘干;加入1×TE(pH值8.0)缓冲液溶解,加5 μL的RNase(10 mg/mL),37℃消化1 h;抽提出的DNA样品用QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (lot 69104)进行纯化后-20℃保存。

1.2.3 玉米SNP3072芯片对3901I突变体定位

此方法参照参考文献[24、25],具体方法如下:取F₂代果穗的野生型和突变体子粒各40粒,去种皮后分别混为两个基因组混池:野生型基因组混池(基因型为WT/WT和WT/3901I)和突变体基因组混池(3901I/3901I)。取750 ng野生型基因组混池的DNA和250 ng突变体基因组混池的DNA合并为1 μg F₁基因组混样;再准备1 μg突变体基因组混池的DNA作为突变体基因组样。使用MaizeSNP3072芯片对野生型基因组混样和突变体基因组样进行基因分型分析。

1.2.4 RNA提取、反转录及开放阅读框(ORF)扩增

取授粉后15 d的野生型和突变体子粒各10粒,剥离种皮后用总RNA提取试剂盒(天根, Lot Q5905)进行抽提。取1 μg总RNA用反转录试剂盒(全式金, AT301-03)反转为cDNA。用DNA聚合酶(TOYOBO, KOD-201)扩增ORF(引物为:*O2*-ORF-S: ATGGAG-CACGTCATCTCAAT; *O2*-ORF-A: CTAATACAT-GTCCATGTGTAT)。PCR扩增程序为,95℃预变性5min;95℃变性30 s,60℃复性30 s,68℃延伸90 s,共进行35个循环。

1.2.5 总蛋白抽提及western blot检测

将授粉后15 d的野生型和突变体子粒去种皮后,用液氮研磨至粉末,准确称取500 mg粉末溶于1 mL的IP裂解液中(20 mmol/L Tris-HCl,pH值7.5;150 mmol/L NaCl;1 mmol/L EDTA;0.5% NP-40),加入终浓度为1 mmol/L的PMSF和cocktail,4℃旋转15 min,13 000 r/min、4℃离心10 min,将上清转移至新的EP管中-80℃保存(上清液即为总蛋白);取抽提好的总蛋白变性后用12.5%的SDS-PAGE蛋白胶电

泳(120 V, 90 min);将胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜上,用封闭液[终浓度为5%的溶于TBST(10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 7.5; 150 mmol/L NaCl; 0.05% (V/V) Tween-20的脱脂牛奶]封闭1 h,再用O2特异的抗体(用1:1 000封闭液稀释)孵育1 h, TBST溶液洗6遍,用羊抗兔稀释溶液(Sigma, A0545,用封闭液1:5 000稀释)孵育30 min, TBST溶液洗3遍,在化学发光图像分析仪(Tanon 5200)上显影。

2 结果与分析

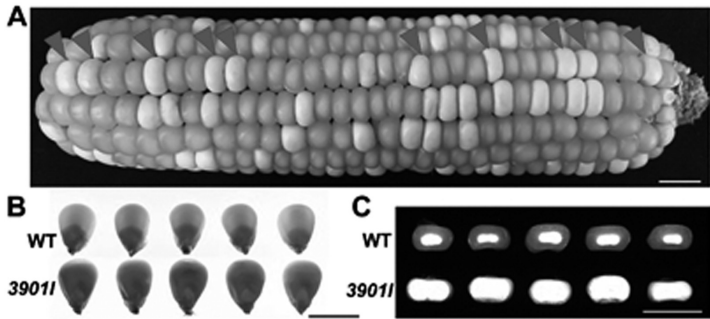
2.1 *3901l*突变体表型分析

将 *3901l* 突变体与 W22 自交系杂交后获得杂合 F₁ 代群体, F₁ 代植株自交后获得 F₂ 代表型分离的果

穗用于后续实验。F₂ 代果穗的野生型与突变体子粒的比例符合 3:1 ($\chi^2 < \chi^2_{0.05,1}$), 说明该 *3901l* 是一个单基因隐性突变体(表 1)。突变体子粒的颜色较野生型浅且光下不透明;对子粒横切面进行观察,发现突变体子粒的横切面呈现出完全粉质状态(图 1)。

表 1 F₂ 代果穗上子粒的卡方测试
Table 1 Chi-square analysis of the kernel number on the maize F₂ ear

项 目	F ₂ 果穗-1	F ₂ 果穗-2	F ₂ 果穗-3
Item	F ₂ ear-1	F ₂ ear-2	F ₂ ear-3
野生型表型子粒	188	156	146
突变表型子粒	59	57	46
χ^2	0.109 3	0.264 5	0.625 1



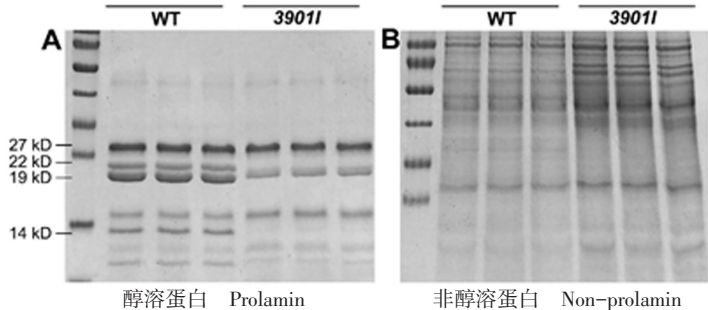
注:A 为 *3901l* 突变体 F₂ 代果穗图; 深灰箭头标注的为果穗其中一行中所有突变体子粒; B 为灯箱下观察野生型(wild type, WT)和 *3901l* 突变体子粒表型; C 为野生型和 *3901l* 突变体子粒横切面观察(所有标尺均为 1 cm)。
Note: A, *3901l* mutant F₂ generation ear map; The gray arrow indicated all mutant seeds in one of the rows of the ear; B, Observing the wild type(WT) and *3901l* mutant seed phenotype under the light box; C, Cross-section of wild type and *3901l* mutant seeds(all scales were 1 cm).

图 1 *3901l* 突变体表型观察
Fig.1 The phenotype of *3901l* mutant kernel

2.2 *3901l* 突变体生化成分分析

由于大部分玉米粉质突变体均是由于醇溶蛋白的改变造成,抽取同一果穗的野生型合和突变体子

粒的醇溶蛋白和非醇溶蛋白进行观察。结果表明, *3901l* 突变体子粒的 14-kD 和 22-kD 醇溶蛋白消失, 19-kD 醇溶蛋白剧烈下降, 非醇溶蛋白显著升高(图 2)。



注:A 为考马斯亮蓝染色显示野生型(wild type, WT)和 *3901l* 突变体胚乳醇溶蛋白电泳结果; B 为考马斯亮蓝染色显示野生型和 *3901l* 突变体胚乳非醇溶蛋白考马斯亮蓝染色结果。
Note: A, Coomassie blue staining showed wild-type(WT) and *3901l* mutant endosperm electrophoresis results; B, Coomassie blue staining showed wild-type and *3901l* mutant endosperm non-gliadin Coomassie blue staining results.

图 2 *3901l* 突变体胚乳生化成分分析
Fig.2 Biochemical analysis of the component in *3901l* endosperm

2.3 3901l突变体基因的芯片定位

利用玉米SNP3072芯片对候选基因进行染色体定位,结果表明,突变体基因被定位于7号染色体

9 916 138 ~ 43 134 159 bp 约33 M的区间(可信度标准采用大于0.7,图3)。

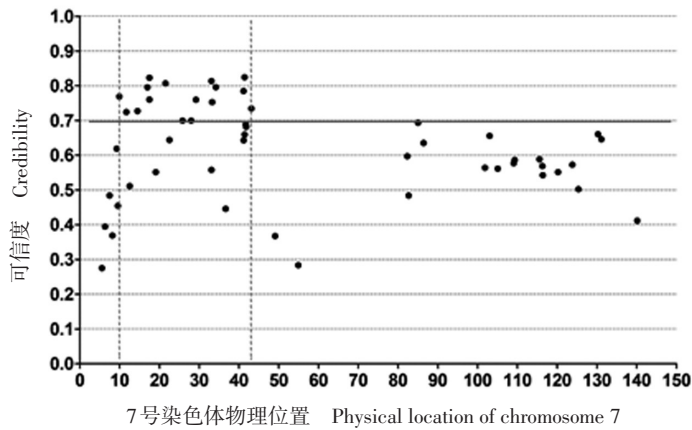


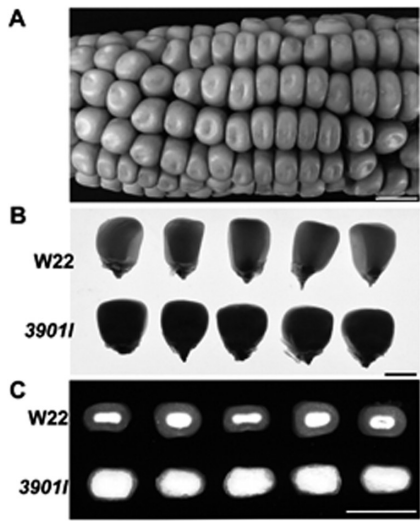
图3 玉米SNP3072芯片基因分型分析

Fig.3 Maize SNP3072 genotyping array analysis

2.4 等位测试确认3901l是o2的等位突变体

由于3901l突变体醇溶蛋白的变化与已知粉质突变体opaque2(o2)的变化非常相似,并且O2基因也落在3901l的定位区间中,将3901l突变体与本实验

已有的o2突变体(o2-w22)进行等位测试。结果表明,等位测试所得果穗的子粒呈现出粉质不透明表型,证明3901l确实是o2的等位突变体(图4)。



注:A为3901l突变体与o2突变体杂交后得到的等位测试果穗;B为灯箱下观察野生型子粒(W22自交系)和等位测试果穗子粒的表型;C为野生型子粒(W22自交系)和等位测试果穗子粒横切面观察。

Note: A, the allelic test ear obtained after the 3901 mutant and the o2 mutant hybrid; B, the wild type seed(W22 inbred) and the phenotype of the allometric test ear granule under the light box; C, the wild type granule(W22 inbred line) and allelic test of the cross section of the ear body.

图4 3901l突变体与o2突变体等位测试

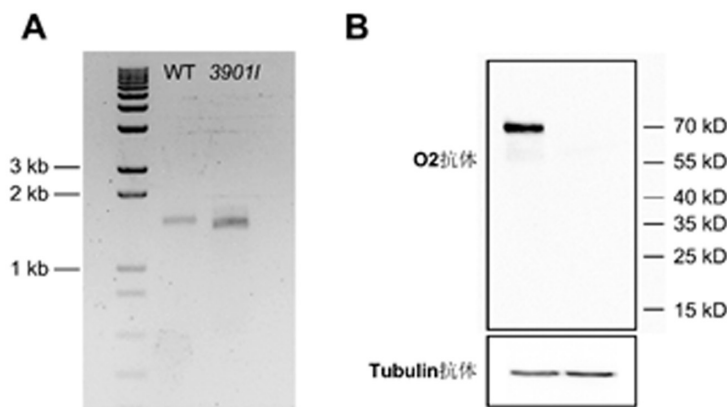
Fig.4 Allelism test between 3901l and o2

2.5 3901l突变本质研究

抽取授粉后15 d的野生型和突变体子粒的总RNA,以Oligo-dT为引物进行反转录获得cDNA,以cDNA为模板扩增O2(GRMZM2G015534)的ORF。结

果表明,突变体扩增出的ORF较野生型小。将扩增出的片段测序发现,突变体O2的ORF缺失了第二个外显子(61 bp),造成距起始密码子474个核苷酸的地方出现终止密码子,理论上翻译出的截短蛋白

为158个氨基酸,预测大小为17 kD。用本实验室已有的O2特异的抗体检测授粉后15 d的子粒总蛋白,发现野生型子粒总蛋白中可以检测到大小约为70 kD的单一一条带,而突变体中不能检测到任何条带(图5)。



注:A为以WT和3901l突变体的cDNA为模板扩增O2基因的ORF结果图;B为用O2特异抗体检测授粉后15 d的野生型和突变体子粒总蛋白;Tubulin抗体作为内参拉平总蛋白上样量。

Note: A, the ORF results of O2 gene amplification using the cDNA of WT and 3901l mutants as template; B, the total protein of wild type and mutant seeds after 15 days of pollination was detected by O2-specific antibody; tubulin antibody was used as internal reference protein loading.

图5 3901l突变体突变本质
Fig.5 The molecular mechanism of mutation of 3901l

3 结论与讨论

玉米是目前世界上种植最广泛、产量最高的粮食作物。但是由于胚乳中一些必须氨基酸的含量较低,科学家们一直致力于改善玉米子粒的营养品质。Menz等首次发现了o2突变体,该突变体由于造成玉米子粒醇溶蛋白大幅度下调,非醇溶蛋白含量剧烈升高,导致胚乳氨基酸构成和比例发生改变,显著提高了赖氨酸和色氨酸等多种必需氨基酸的含量。

本研究对象来源于美国种质中心名为3901l的粉质胚乳突变体。该突变体子粒大小与野生型无明显差异,呈现出典型的粉质胚乳突变体的特征—胚乳光下不透明,横切面完全粉质。该突变体醇溶蛋白的变化与o2突变体的变化极为一致(14 kD和22 kD醇溶蛋白完全消失,非醇溶蛋白大幅度升高),并且其芯片定位区间也包含O2基因。通过等位测试确认3901l是o2的等位突变体。进一步研究表明,3901l突变中O2转录本缺失了一个61-bp的外显子,造成转录本的开放阅读框移码,从而使蛋白翻译提前终止。蛋白层面的研究表明,O2蛋白在突变体中完全检测不到,无法检测到提前终止的蛋白,说明错误翻译的O2蛋白可能被机体识别并快速降解。

MaizeGDB虽然公布多个o2的等位突变体,但仅有个别o2等位突变体的突变本质被解析^[26,27]。本研究鉴定和解析了一个全新的o2等位突变体,其突变方式与其他已知o2等位突变体的突变方式均不

相同,可为研究O2蛋白稳定性提供新的遗传材料。

参考文献:

- [1] Esen A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize(*Zea mays* L.)[J]. Journal of Cereal Science, 1987, 5 (2): 117-128.
- [2] Coleman C E, Larkins B A. The prolamins of maize[J]. Springer Netherlands, 1999: 109-139.
- [3] Thompson G A, Larkins B A.Characterization of zein genes and their regulation in maize endosperm[J]. Springer New York, 1994: 639-647.
- [4] Wang G, Wang F, Wang G, et al. Opaque1 encodes a myosin XI motor protein that is required for endoplasmic reticulum motility and protein body formation in maize endosperm[J]. Plant Cell, 2012, 24 (8): 3447-3462.
- [5] Feng F, Qi W, Lü Y, et al. Opaque11 is a central hub of the regulatory network for maize endosperm development and nutrient metabolism[J]. Plant Cell, 2018, 30: 375-396.
- [6] Mertz E T, Nelson O E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm[J]. Science, 1964, 145(3629): 279.
- [7] Myers A M, James M G, Lin Q, et al. Maize opaque5 encodes monogalactosyldiacylglycerol synthase and specifically affects galactolipids necessary for amyloplast and chloroplast function[J]. Plant Cell, 2011, 23(6): 2331-2347.
- [8] Wang G, Zhang J, Wang G, et al. Proline responding1 plays a critical role in regulating general protein synthesis and the cell cycle in maize[J]. Plant Cell, 2014, 26(6): 2582-2600.
- [9] Wang G, Sun X, Wang G, et al. Opaque7 encodes an acyl-activating enzyme-like protein that affects storage protein synthesis in maize endosperm[J]. Genetics, 2011, 189(4): 1281-295.

- [10] Miclaus M, Wu Y, Xu J H, et al. The maize high-lysine mutant opaque7 is defective in an acyl-CoA synthetase-like protein[J]. Genetics, 2011, 189(4): 1271–1280.
- [11] Yao D, Qi W, Li X, et al. Maize *opaque10* encodes a cereal-specific protein that is essential for the proper distribution of zeins in endosperm protein bodies[J]. PLoS Genet, 2016, 12(8): e1006270.
- [12] Holding D R, Otegui M S, Li B, et al. The maize floury1 gene encodes a novel endoplasmic reticulum protein involved in zein protein body formation[J]. Plant Cell, 2007, 19(8): 2569–2582.
- [13] Coleman C E, Lopes M A, Gillikin J W, et al. A defective signal peptide in the maize high-lysine mutant floury 2[J]. Proc Natl Acad Sci., USA, 1995, 92(15): 6828–6831.
- [14] Li Q, Wang J, Ye J, et al. The Maize Imprinted Gene *Floury3* Encodes a PLATZ Protein Required for tRNA and 5S rRNA Transcription through Interaction with RNA Polymerase III[J]. Plant Cell, 2017, 29(10): 2661–2675.
- [15] Wang G, Qi W, Wu Q, et al. Identification and Characterization of Maize floury4 as a novel semidominant *Opaque* mutant that disrupts protein body assembly[J]. Plant Physiol, 2014, 165(2): 582–594.
- [16] Li C, Qiao Z, Qi W, et al. Genome-Wide characterization of cis-Acting DNA targets reveals the transcriptional regulatory framework of *Opaque2* in maize[J]. The Plant Cell, 2015, 27(3): 532–545.
- [17] Manicacci D, et al. Epistatic interactions between *Opaque2* transcriptional activator and its target gene *CyPPDK1* control kernel trait variation in maize[J]. Plant Physiology, 2009, 150(1): 506–520.
- [18] Vicentecarbajosa J, Camuskulandaivelu L, Fourmann M, et al. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator *Opaque2*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(14): 7685–7690.
- [19] Zhang Z, Yang J, Wu Y. Transcriptional regulation of *Zein* Gene expression in maize through the additive and synergistic action of *opaque2*, Prolamine-Box binding factor, and *O2* heterodimerizing proteins[J]. Plant Cell, 2015, 27(4): 1162–1172.
- [20] Schmidt R J, Ketudat M, Aukerman M J, et al. *Opaque-2* is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes[J]. Plant Cell, 1992, 4(6): 689–700.
- [21] Cord N G, Yunes J A, Da S M, et al. The involvement of *Opaque 2* on beta-prolamin gene regulation in maize and Coix suggests a more general role for this transcriptional activator[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27(5): 1015–1029.
- [22] Wallace J C, Lopes M A, Paiva E, et al. New methods for extraction and quantitation of *Zeins* reveal a high content of *gamma-Zein* in modified *opaque-2* maize[J]. Plant Physiol, 1990, 92(1): 191–196.
- [23] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8(19): 4321–4325.
- [24] Tian H L, Wang F G, Zhao J R, et al. Development of maizeSNP3072, a high-throughput compatible SNP array, for DNA fingerprinting identification of Chinese maize varieties[J]. Mol Breed, 2015, 35(6): 136.
- [25] Chen X, Feng F, Qi W, et al. Dek35 encodes a PPR protein that affects cis-splicing of mitochondrial nad4 intron 1 and seed development in maize[J]. Mol Plant, 2016, 10: 427–441.
- [26] Gavazzi F, Lazzari B, Ciceri P, et al. Wild-type *opaque2* and defective *opaque2* polypeptides form complexes in maize endosperm cells and bind the *opaque2-zein* target site[J]. Plant Physiol, 2007, 145(3): 933–945.
- [27] Bernard L, Ciceri P, Viotti A. Molecular analysis of wild-type and mutant alleles at the *Opaque-2* regulatory locus of maize reveals different mutations and types of *O2* products[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 24(6): 949.

(责任编辑:朴红梅)